

© ДАНЧЕНКО Е.О., 2002

ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ГЕПАТОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ И ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ПЕЧЕНИ

ДАНЧЕНКО Е.О.

*Витебский государственный медицинский университет
Кафедра биологической химии*

Резюме. В экспериментах на 1500 крысах показано, что в пределах терапевтического диапазона доз гепатотропные препараты могут: 1) не обладать цитотоксичностью и воздействовать на метаболические потоки и их регуляцию; 2) обладать цитотоксичностью и действовать через стимуляцию процессов физиологической регенерации гепатоцитов. Для оценки цитотоксичности гепатотропных препаратов предложено применять исследования на клетках с редуцированным эндоплазматическим ретикулом (прямое цитотоксическое действие), перитонеальных макрофагах (опосредованное цитотоксическое действие) и гепатоцитах (действие через механизмы некроза или апоптоза). Препарат урсодезоксихолевой кислоты, обладая цитотоксичностью в терапевтическом диапазоне доз, оказывает микроальтерационное действие на отдельные гепатоциты и через синхронизацию вступления клеток печени в митотическое деление обеспечивает более быстрое и совершенное течение процессов репаративной регенерации печени. Препарат тауроурсодезоксихолевой кислоты может усиливать регенерацию внутриклеточных структур, например, митохондрий, стимулировать метаболизм и ускорять течение восстановительных процессов в печени. Экстракт солянки холмовой не обладает повреждающим действием на клетки печени в терапевтическом диапазоне доз и стимулирует восстановительные процессы, благодаря доставке аминокислот с разветвленным радикалом, аминокислот, необходимых для осуществления антитоксической функции печени и других низкомолекулярных метаболитов и биорегуляторов.

Ключевые слова: цитотоксичность, гепатопротекторы, печень, регенерация.

Abstract. The experiments on 1500 rats have shown that hepatotropic preparations in therapeutic range of doses can: 1) have no cytotoxicity and influence the metabolic ways and their regulation; 2) have cytotoxicity and affect through stimulation of hepatocytes physiological regeneration processes. To estimate hepatotropic preparations cytotoxicity researches on the cells with reduced endoplasmatic reticulum (direct cytotoxic effect), peritoneal macrophages (indirect cytotoxic effect) and hepatocytes (effect through necrosis or apoptosis) are suggested. Ursodeoxycholic acid, having cytotoxicity in therapeutic range of doses, causes damage to separate hepatocytes and provides a faster and perfect course of processes of reparative regeneration of the liver through synchronization of the involving of the liver cells in mitotic division. Tauroursodeoxycholic acid can stimulate regeneration of intracellular structures, for example, mitochondria, activate metabolism and accelerate liver restoration processes. Extract of *Salsola collina* has no damaging effect on the liver cells in therapeutic range of the doses and stimulates regenerative processes, due to the delivery of the branched-chain aminoacids, the aminoacids necessary for the liver antitoxic function and other low-molecular metabolites and bioregulators.

Новые представления о молекулярных механизмах повреждения клеток печени и их гибели путем апоптоза и/или некроза требуют пересмотра и дополнения принципов фармакологического управления восстановительными процессами в органе. Для совершенствования медицинских технологий лечения заболеваний печени, кроме информации о

фармакокинетики, фармакодинамики и терапевтическом диапазоне доз гепатотропных препаратов, необходимы сведения о влиянии их на регенераторные процессы, а также на метаболические потоки и их регуляцию [7,9].

Цель настоящей работы заключалась в разработке концепции управления восстановительными процессами в печени, основанной на молекулярно-структурных механизмах цитотоксичности гепатотропных препаратов.

Адрес для корреспонденции: 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный медицинский университет, кафедра биологической химии - Данченко Е.О.

Методы

Эксперименты поставлены на 1500 белых беспородных крысах-самцах массой 180-200 г. Гепатотропные препараты урсодезоксихолевая кислота (УДХК) и тауроурсодезоксихолевая кислота (ТУДХК) предоставлены фирмой Dr. Falk Pharma GmbH (Германия), экстракт солянки холмовой (ЭСХ) – научно-производственной фирмой “Фитос” (Москва), гликохенодесоксихолевая кислота (ГХДХК) производства фирмы Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Исследование цитотоксичности гепатотропных препаратов проводили на культурах клеток L929, L41, перитонеальных макрофагах мышей и первичной культуре гепатоцитов по методике, описанной ранее [2]. Оценку апоптоза гепатоцитов производили методом электрофореза в агарозном геле и флюоресцентной микроскопией гепатоцитов после окрашивания флюорохромом Hoechst 22253, некроза – по высвобождению лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в инкубационную среду и флюоресцентной микроскопией после окрашивания гепатоцитов пропидиум йодидом [3]. Активность ЛДГ в культуральной среде определяли с помощью наборов фирмы Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Активность общей ЛДГ оценивали после обработки монослоя гепатоцитов 0,1 % раствором тритона X-100.

Препараты УДХК, ТУДХК и ЭСХ вводили интрагастрально в дозе 200 мг/кг в течение 20 дней. Контрольные животные получали 1% раствор метилцеллюлозы (МЦЛ). Часть животных через сутки после последнего введения подвергалась частичной гепатэктомии (ЧГЭ) по методу Хиггинса и Андерсона [8], частичной ишемии путем окклюзии микрозажимом центральной и левой боковой долей печени в течение 60 или 180 мин. или тотальной ишемии печени в течение 30 мин.

Интенсивность синтеза ДНК в гепатоцитах оценивали по включению [³H]тимидина, который вводили в дозе 40 мкКи в крысу за 2 часа до декапитации [4]. Количество ДНК и РНК в гомогенатах и ядрах определяли по методу Blober и Potter [6]. Ядра

гепатоцитов получали методом дифференциального центрифугирования [1]. Удельную радиоактивность ДНК рассчитывали как импульсы/минуту/1 мг ДНК.

Морфологические исследования ткани печени проводили в парафиновых срезах, окрашенных гематоксилин-эозином. Производили морфометрическую оценку воспалительных признаков в гепатоцитах, дегенеративных изменений и регенераторных процессов. Для электронно-микроскопических исследований кусочки печени фиксировали 1% раствором четырехокиси осмия на 0,1 М буфере Миллонига при pH 7,4 и температуре 4 °C в течение 2 ч, затем дегидратировали в спиртах восходящей концентрации и ацетоне и заливали в смесь эпона и аралдита. Срезы, изготовленные на ультратоме LKB-III, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и изучали с помощью электронного микроскопа ПЭМ-100 при увеличениях 4,6 и 10 тысяч.

Цифровой материал подвергался статистической обработке по Стьюденту.

Результаты и обсуждение

В экспериментах *in vitro* показано, что УДХК в дозах 50 и 100 мкг/мл не обладала цитотоксическим эффектом на клетки L929. При дозах препарата 400 и 1000 мкг/мл отмечалось уменьшение числа клеток в монослое, и через 48 часов инкубации количество клеток составило 74,2% и 81,5% от контроля, соответственно. Степень цитотоксичности увеличивалась в процессе инкубации и имела дозозависимый характер (рис. 1). Через 96 часов эксперимента наиболее выраженный ингибирующий эффект на пролиферацию клеток отмечался при дозах препарата 200-1000 мкг/мл. Через 48 часов инкубации клеток L929 с УДХК скорость включения [³H]тимидина в ДНК снижалась на 62%, 99,1% и 99,4% при дозах препарата 200, 400 и 1000 мкг/мл, соответственно (рис. 2). Данный эффект сохранялся через 96 часов эксперимента. При инкубации клеток линии L41 с УДХК выявлено уменьшение числа клеток в монослое при дозах выше 100 мкг/мл, ингибирование биосинтеза ДНК на 16,6%- 93,6% (48 часов) и 19,5%-95,03% (96 часов) при всех исследуемых дозах препарата.

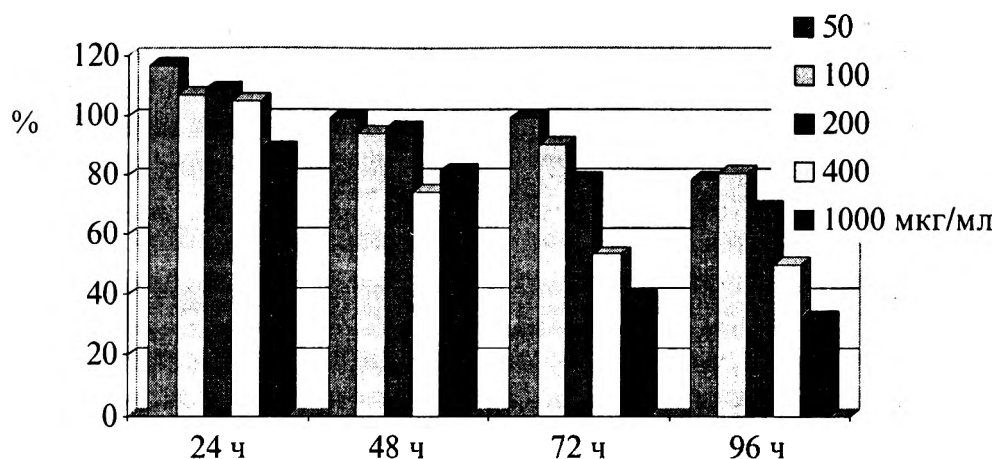


Рис. 1. Влияние УДХК на рост клеток L929.

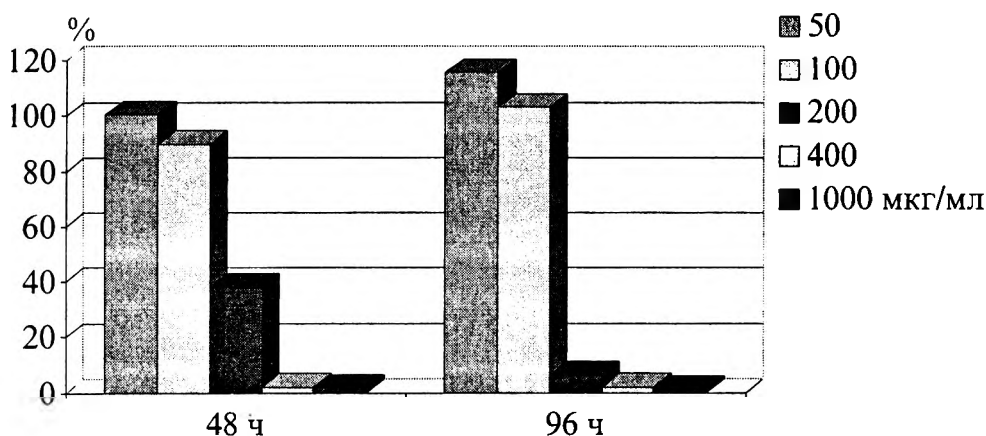
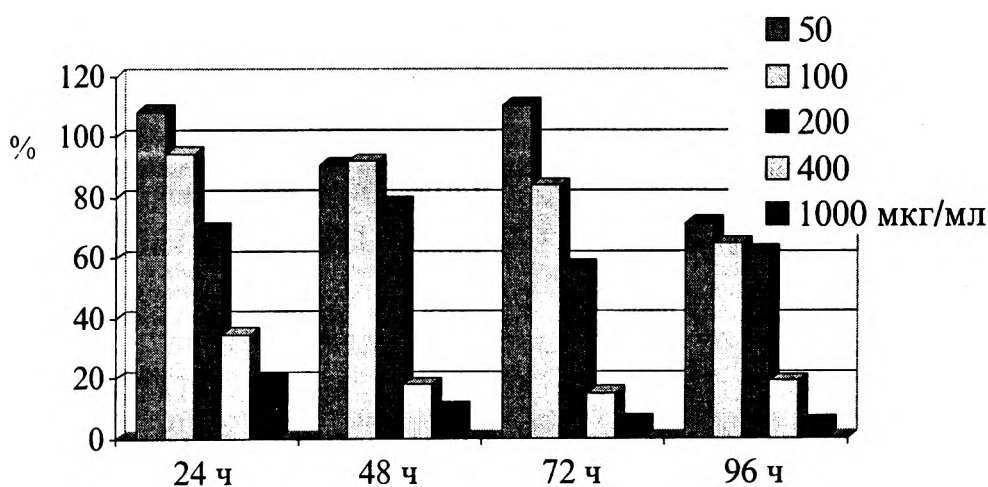
Рис. 2. Влияние УДХК на включение $[^3\text{H}]$ тимидина в ДНК клеток L929.

Рис. 3. Влияние УДХК на биосинтез белка в клетках L929.

После инкубации клеток L929 и L41 с УДХК отмечено выраженное снижение биосинтеза белка при дозах препарата 200-1000 мкг/мл (рис. 3). При инкубации клеток L929 с препаратом ТУДХК в диапазоне доз 50-1000 мкг/мл не обнаружено изменения числа клеток в

монослое в течение всего периода эксперимента, снижения включения $[^3\text{H}]$ тимидина в ДНК и меченой смеси аминокислот в белки клеток L929 при дозах 50-400 мкг/мл. ЭСХ не обладал прямой цитотоксичностью на данных культурах клеток в диапазоне концентраций

50-1000 мкг/мл, а в дозах 50-200 мкг/мл стимулировал биосинтез белков на 20-50% в клетках L929 и в клетках линии L41 через 24 часа инкубации при дозах препарата 200 и 400 мкг/мл на 20% и 62%, соответственно.

Все три исследуемых препарата не оказывали опосредованного цитотоксического эффекта на пролиферацию клеток через секрецию фактора некроза опухоли перитонеальными макрофагами мышей.

В исследованиях на первичной культуре гепатоцитов крыс изучено влияние гепатотропных веществ на процессы некроза и апоптоза. В качестве индуктора повреждения гепатоцитов использовали гликохенодезоксихолевую кислоту (ГХДХК). Через 4 часа

инкубации гепатоцитов с ГХДХК в дозах 25-50 мкг/мл по активности ЛДГ в инкубационной среде выявлены признаки цитолитического эффекта (рис. 4). При концентрациях ГХДХК 100-400 мкг/мл высвобождение ЛДГ в инкубационную среду увеличивалось с $4,89 \pm 0,19\%$ (контроль) до $45,7 \pm 0,19\%$ (400 мкг/мл) ($P < 0,05$). Увеличение активности ЛДГ при инкубации с УДХК и ТУДХК отмечено только при концентрации 400 мкг/мл. ЭСХ не обладал цитотоксичностью в изученном диапазоне доз.

Инкубация гепатоцитов с 50 мкг/мл ГХДХК индуцировала апоптоз, что подтверждалось наличием типичной ДНК "лестницы" (рис. 5), конденсацией хроматина и фрагмента-

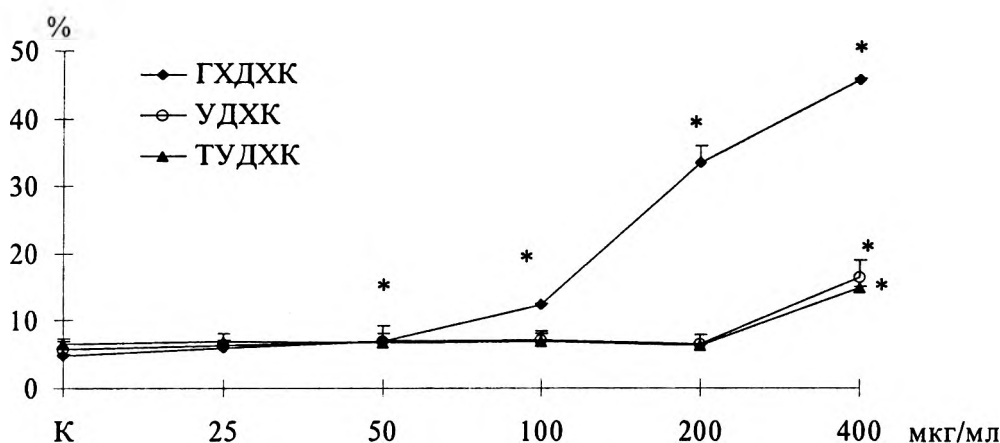


Рис. 4. Влияние ГХДХК, УДХК, ТУДХК и ЭСХ на высвобождение ЛДГ в инкубационную среду.

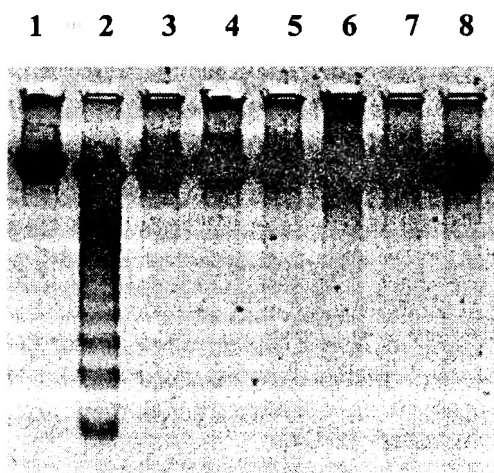


Рис. 5. Влияние ГХДХК, ТУДХК, УДХК и ЭСХ на межнуклеосомную фрагментацию ДНК. 1 — контроль, 2 — ГХДХК (50 мкг/мл), 3 — ТУДХК (50 мкг/мл), 4 — ТУДХК (200 мкг/мл), 5 — УДХК (50 мкг/мл), 6 — УДХК (200 мкг/мл), 7 — ЭСХ (50 мкг/мл), 8 — ЭСХ (200 мкг/мл).

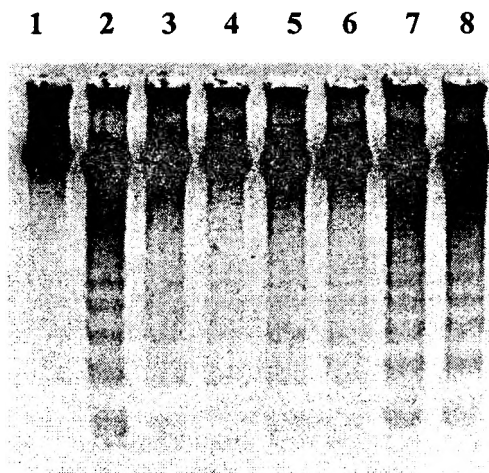


Рис. 6. Влияние ТУДХК, УДХК и ЭСХ на межнуклеосомную фрагментацию ДНК при инкубации с ГХДХК (50 мкг/мл). 1 — контроль, 2 — ГХДХК 50 мкг/мл, 3 — ГХДХК + ТУДХК 50 мкг/мл, 4 — ГХДХК + ТУДХК 200 мкг/мл, 5 — ГХДХК + УДХК 50 мкг/мл, 6 — ГХДХК + УДХК 200 мкг/мл, 7 — ГХДХК + ЭСХ 50 мкг/мл, 8 — ГХДХК + ЭСХ 200 мкг/мл.

цией ядра. После инкубации с ГХДХК количество апоптотических клеток повышалось с $0,67 \pm 0,8\%$ в контроле до $15,2 \pm 3,49\%$ в экспериментальной группе (таблица). ТУДХК, УДХК и ЭСХ не вызывали ни апоптоз, ни некроз гепатоцитов (рис. 5, таблица). Препараты желчных кислот оказывали антиапоптозогенный эффект, ТУДХК (50 мкг/мл и 200 мкг/мл) и ЭСХ (200 мкг/мл) проявили антинекрозогенное действие, характеризующееся уменьшением числа клеток, окрашенных пропидиум йодидом (рис. 6, таблица).

биосинтетические процессы препарат ЭСХ.

Введение УДХК интактным животным вызвало появление в печени единичных клеток с вакуольной дистрофией, лизисом и пикнозом ядер, а также единичных микро-некрозов. При электронной микроскопии не выявлено изменений ядер и ядрышек, однако количество крист в митохондриях, число свободных рибосом было сниженным, число связанных рибосом, гантелеобразных (делящихся) и мелких (новообразованных) митохондрий было увеличено. Введение ин-

Таблица

Влияние ТУДХК, УДХК и ЭСХ на апоптоз и некроз гепатоцитов

Препарат (мкг/мл)	% апоптоза	% некроза
Контроль	$0,67 \pm 0,8$	$1,90 \pm 1,01$
ГХДХК 50	$15,2 \pm 3,49^*$	$6,28 \pm 1,0^*$
ТУДХК 50	$1,73 \pm 0,42^\dagger$	$2,1 \pm 1,13^\dagger$
ТУДХК 200	$1,87 \pm 0,50^\dagger$	$2,77 \pm 0,67^\dagger$
УДХК 50	$1,07 \pm 0,46^\dagger$	$1,7 \pm 0,82^\dagger$
УДХК 200	$1,80 \pm 0,72^\dagger$	$2,63 \pm 0,67^\dagger$
ЭСХ 50	$0,93 \pm 0,31^\dagger$	$2,4 \pm 1,06^\dagger$
ЭСХ 200	$1,87 \pm 0,42^\dagger$	$2,33 \pm 0,23^\dagger$
ГХДХК 50 + ТУДХК 50	$4,17 \pm 1,35^*^\dagger$	$2,9 \pm 0,79^\dagger$
ГХДХК 50 + ТУДХК 200	$2,33 \pm 1,67^\dagger$	$1,67 \pm 0,70^\dagger$
ГХДХК 50 + УДХК 50	$7,2 \pm 0,35^*^\dagger$	$7,0 \pm 0,2^*$
ГХДХК 50 + УДХК 200	$5,43 \pm 0,75^*^\dagger$	$8,93 \pm 3,91^*$
ГХДХК 50 + ЭСХ 50	$13,57 \pm 2,15^*$	$5,43 \pm 0,78$
ГХДХК 50 + ЭСХ 200	$12,57 \pm 2,05^*$	$5,20 \pm 0,61^\dagger$

Примечание: * - $P < 0,05$ по сравнению с контролем, † - $P < 0,05$ по сравнению с ГХДХК

Таким образом, исследуемые препараты по цитотоксическому эффекту *in vitro* можно разделить на три типа: обладающий прямой цитотоксичностью в дозах, превышающих 100 мкг/мл препарат УДХК, не обладающий цитотоксичностью препарат ТУДХК, и не обладающий цитотоксичностью и стимулирующий пролиферацию и

интактным животным ЭСХ не оказало влияния на морфологическую картину срезов печени при световой и электронной микроскопии. Интрагастральное введение ТУДХК, не обладающей цитотоксичностью, не выявило микроальтерационных эффектов препарата при морфологическом исследовании срезов печени крыс. При элект-

ронной микроскопии выявлены признаки активации внутриклеточных регенераторных процессов, характеризующихся наличием многочисленных полиморфных митохондрий и гантелеобразных (делящихся) форм митохондрий, множества свободных рибосом.

Посредством светооптической морфометрии установлено, что в печени крыс, получавших УДХК, достоверно увеличено количество митозов ($0,28 \pm 0,032\%$), двуядерных ($80,7 \pm 8,25\%$) и гиперхромных ($2,5 \pm 0,08\%$) клеток по сравнению с интактными животными ($0,03 \pm 0,012\%$, $23,5 \pm 4,5\%$ и $0,97 \pm 0,07\%$, $P < 0,001$), что предполагает стимуляцию физиологической регенерации печени на клеточном уровне. При морфомет-

уровня ДНК в гомогенатах печени и ядрах гепатоцитов крыс, получавших УДХК. Содержание РНК гомогенатов и ядер у подопытных животных в этот период превышало контрольные значения. У крыс, получавших МЦЛ, к 10 суткам регенерации содержание ДНК в гомогенатах и ядрах оставалось сниженным и отмечалась тенденция к нормализации содержания РНК. Исследование удельной радиоактивности ДНК показало, что включение [^3H]тимидина через 24 часа после ЧГЭ у крыс, получавших УДХК, было ниже, чем в контроле. Изучение динамики включения радиоактивного предшественника в ДНК гепатоцитов выявило смещение пика синтеза ДНК на 18-24 часа после ЧГЭ (контрольная группа 24-30ч) (рис. 7).

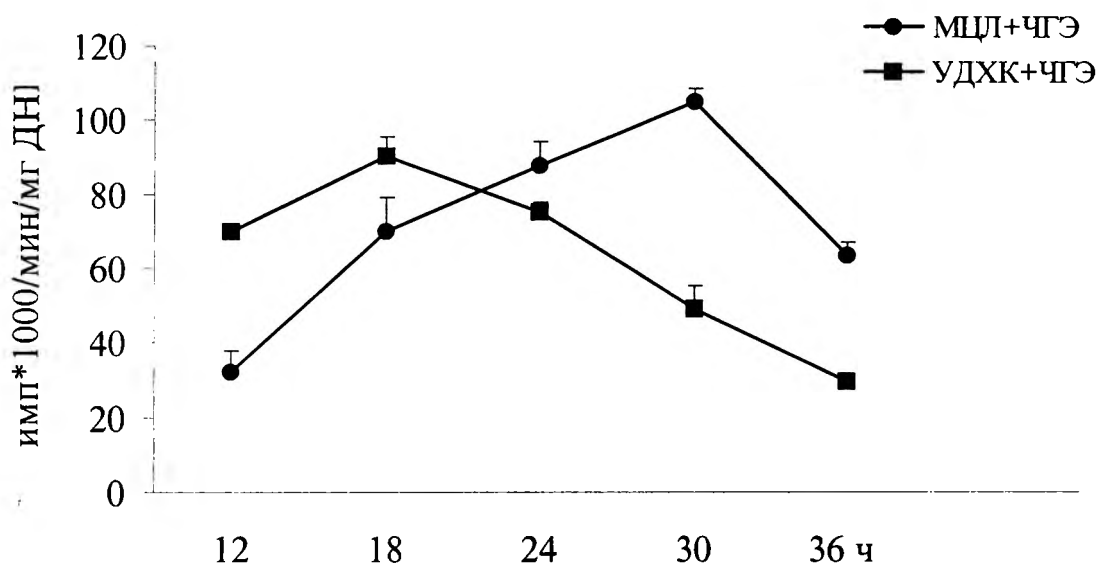


Рис. 7. Влияние УДХК на включение [^3H]тимидина в ДНК ядер гепатоцитов в течение 36 часов после ЧГЭ.

рическом анализе печени крыс, получавших ТУДХК, обнаружено достоверное увеличение количества гиперхромных ($1,32 \pm 0,12\%$, $P < 0,05$) и двуядерных клеток ($39,5 \pm 1,27\%$, $P < 0,01$), что является признаком активации внутриклеточной регенерации.

Через 24 часа после ЧГЭ в гепатоцитах крыс, получавших УДХК, снижалось содержание РНК в ядрах и повышалось в гомогенатах, что может быть связано с усиленным транспортом РНК в цитозоль. Содержание ДНК в обеих фракциях увеличивалось по сравнению с контрольной группой. Через 96 часов после ЧГЭ обнаружена нормализация

В митотическую фазу репаративной регенерации печени (1-4 сутки после ЧГЭ) у крыс, предварительно получавших УДХК, митотическая активность гепатоцитов была достоверно выше ($12,3 \pm 1,86\%$), чем у крыс, получавших МЦЛ ($7,24 \pm 0,76\%$, $P < 0,001$). В гипертрофическую фазу репаративной регенерации печени (6-10 сутки после ЧГЭ) у подопытных крыс митотический индекс был достоверно ниже ($0,15 \pm 0,016\%$), чем в контроле ($0,30 \pm 0,026\%$, $P < 0,001$), а морфологические изменения в регенерирующих гепатоцитах были выражены в меньшей степени, чем у контрольных животных. Таким обра-

зом, микроальтерационное действие УДХК стимулировало процессы физиологической регенерации печени, что сопровождалось более выраженной репаративной регенерацией после ЧГЭ.

В печени крыс, получавших ЭСХ, через 24 часа после ЧГЭ митотический индекс составил $9,25 \pm 0,06\%$, количество гиперхромных клеток - $1,22 \pm 0,03\%$, что превышало значения этих параметров у крыс, получавших МЦЛ ($7,24 \pm 0,76\%$, $P < 0,05$ и $0,54 \pm 0,06\%$, $P < 0,001$, соответственно). Репаративная регенерация печени у крыс, предварительно получавших ЭСХ, характеризовалась увеличением включения [^3H]тимидина в ДНК на 49,2% в гомогенатах и на 110,4% в ядрах гепатоцитов через 24 часа после ЧГЭ и была достоверно выше в течение 36 часов после ЧГЭ. Учитывая, что введение интактным животным ЭСХ приводит к накоплению общего пула аминокислот в печени [5], стимуляция репаративной регенерации печени ЭСХ обуслав-

Репаративная регенерация печени после 60-минутной частичной ишемии печени характеризовалась смещением пика включения [^3H]тимидина в ДНК на 18 ч после ишемии у крыс, получавших УДХК (контрольная группа – 24 ч), более выраженным увеличением содержания РНК в ранние сроки регенерации и нормализацией содержания ДНК к 4-м суткам реперфузионного периода. Двухдневное введение УДХК предотвращало уменьшение скорости биосинтеза ДНК через 12 часов и увеличивало интенсивность биосинтеза ДНК в 1,46 раза через 24 часа и в 1,34 раза через 30 часов после 180-минутной частичной ишемии печени. Предварительное введение ТУДХК способствовало увеличению удельной радиоактивности ДНК ядер гепатоцитов ишемизированной доли печени после 180-минутной частичной ишемии на протяжении всего постишемического периода в 1,21-1,36 раза, но без смещения пика биосинтеза ДНК (рис. 8).

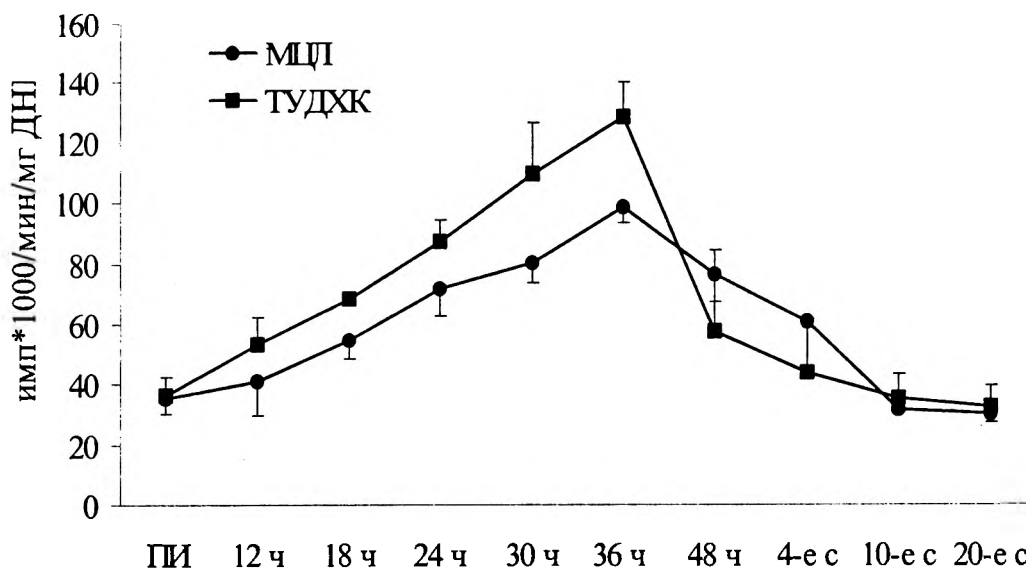


Рис. 8. Влияние ТУДХК на включение [^3H]тимидина в ДНК ядер гепатоцитов крыс после 180-минутной частичной ишемии. ПИ – после ишемии.

ливается, вероятно, доставкой низкомолекулярных субстратов, в том числе аминокислот, необходимых для биосинтеза нуклеиновых кислот.

Стимуляция репаративной регенерации печени через первичный микроальтерационный эффект при применении УДХК была доказана на модели ишемии печени.

Электронно-микроскопическое исследование показало более значительные изменения ультраструктур гепатоцитов на 4-е сутки после 180-минутной ишемии после введения УДХК и признаки усиления функциональной напряженности клеточных структур. Предварительное введение ТУДХК вызвало менее выраженные изменения в ишеми-

зированных долях печени по сравнению с контрольными животными. К 20-м суткам реперфузионного периода у крыс, получавших ТУДХК, выявлена практически полная нормализация ультраструктуры гепатоцитов.

Позитивный эффект УДХК на репаративную регенерацию печени выявлен при 30-минутной общей ишемии: увеличение включения [^3H]тимидина в ДНК ядер гепатоцитов через 24 и 48 часов после ишемии, нормализация содержания РНК. Предварительное введение ТУДХК способствовало ускорению нормализации содержания нуклеиновых кислот и скорости биосинтеза ДНК в печени крыс после 30-минутной общей ишемии.

Выводы

Проведенные исследования показали, что все три исследуемых препарата обладают гепатопротекторными свойствами, которые реализуют через различные механизмы. УДХК вызывает микроальтерирующее действие на клеточном уровне, ТУДХК – на внутриклеточном уровне, что приводит к активации физиологической и репаративной регенерации печени. ЭСХ не обладает цитотоксичностью в рекомендуемом диапазоне доз, и его гепатопротекторный эффект обусловлен дополнительной доставкой аминокислот и низкомолекулярных веществ, оптимизирующих метаболический пул клетки и стимулирующих процессы репаративной регенерации печени.

Литература

1. Абакумова О.Ю. Метод фракционирования меченых клеточных макромолекул с помощью миллипоровых фильтров // *Современные методы в биохимии*: Сб. ст. / Под ред. В. Н. Ореховича. – Москва: Медицина, 1977. – С. 338-341.
2. Данченко Е.О. Использование клеточных культур для оценки цитотоксического эффекта препаратов // *Медицинская панорама*. – 2000. – №2(6). – С. 20-23.
3. Данченко Е.О. Влияние препаратов желчных кислот на апоптоз и некроз гепатоцитов // *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. – 2000. – № 1. – С. 34-40.
4. Стимуляция синтеза ДНК и РНК в печени гепатэктомированных крыс фракциями цитозоля печени и кондиционированной среды, полученной при культивировании эксплантатов печени крыс / Абакумова О.Ю., Куценко Н.Г., Карагюлян С.Р. и др. // *Вопр. мед. химии*. – 1989. – № 1. – С. 69-74.
5. Шейбак В.М. Влияние назначения спиртового экстракта солянки холмовой на спектр свободных аминокислот в тканях здоровых животных // *Клинико-лабораторные аспекты метаболической терапии*: Сб. ст. / Под ред. А. А. Чиркина. – Витебск: Витебский государственный медицинский университет, 1999. – С. 150-152.
6. Blobel G., Potter V.R. Distribution of radioactivity between the acid-soluble pool and pools of RNA in the nuclear, nonsedimentable and ribosome fractions of rat liver after a single injection of labeled orotic acid // *Biochem. Biophys. Acta*. – 1968. – Vol. 166. – P. 48-54.
7. Fawthrop D., Boobis A., Davis D. Mechanisms of cell death // *Arch. Toxicol.* – 1991. – Vol. 65. – P. 437-444.
8. Higgins G.W., Anderson R.M. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal // *Arch. Pathol.* – 1931. – Vol. 12. – P. 186-202.
9. Losser M.-R., Payen D. Mechanisms of liver damage // *Seminar in liver disease*. – 1996. – Vol. 16. – P. 357-367.

Поступила 10.01.2001г.
Принята в печать 12.06.2002г.